DOCKET NO.: 221139US0PCT

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

IN RE APPLICATION OF: Takahiro KAWABATA et al.

SERIAL NO.: NEW U.S. PCT APPLICATION

,

FILED: HEREWITH

INTERNATIONAL APPLICATION NO.: PCT/JP00/06566

INTERNATIONAL FILING DATE: September 25, 2000

FOR: PROCESS FOR DECOMPOSING HARDLY DECOMPOSABLE HARMFUL

SUBSTANCES AND AGENT FOR DECOMPOSING SAID SUBSTANCES

REQUEST FOR PRIORITY UNDER 35 U.S.C. 119 AND THE INTERNATIONAL CONVENTION

Assistant Commissioner for Patents Washington, D.C. 20231

Sir:

In the matter of the above-identified application for patent, notice is hereby given that the applicant claims as priority:

COUNTRY	APPLICATION NO	DAY/MONTH/YEAR
Japan	11-270392	24 September 1999
Japan	2000-208788	10 July 2000
Japan	2000-211258	12 July 2000
Japan	2000-213613	14 July 2000

Certified copies of the corresponding Convention application(s) were submitted to the International Bureau in PCT Application No. PCT/JP00/06566.

Respectfully submitted, OBLON, SPIVAK, McCLELLAND, MAIER & NEUSTADT, P.C.

(703) 413-3000 Fax No. (703) 413-2220 (OSMMN 1/97) Norman F. Oblon

Attorney of Record Registration No. 24,618

Surinder Sachar

Registration No. 34,423

•

20.11.00

PCT

JP00/6566 日

PATENT OFFICE JAPANESE GOVERNMENT

REC'D 0 4 DEC 2000 **WIPO**

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されて いる事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日 Date of Application:

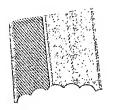
1999年 9月24日

番 顖 Application Number:

平成11年特許願第270392号

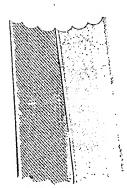
人 Applicant (s):

出光興産株式会社



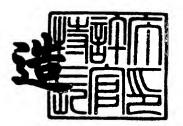
PRIORITY

COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



2000年10月27日

特許庁長官 Commissioner, Patent Office



【書類名】

特許願

【整理番号】

N99-0170

【提出日】

平成11年 9月24日

【あて先】

特許庁長官殿

【国際特許分類】

B09C 1/10

C12N 1/00

【発明の名称】

ダイオキシン類の分解方法

【請求項の数】

4

【発明者】

【住所又は居所】

千葉県袖ケ浦市上泉1280番地

【氏名】

川端 孝博

【発明者】

【住所又は居所】 千葉県袖ケ浦市上泉1280番地

【氏名】

宮本 秀夫

【発明者】

【住所又は居所】

東京都中央区日本橋茅場町三丁目8番8号

【氏名】

鈴木 源士

【特許出願人】

【識別番号】

000183646

【氏名又は名称】

出光與産株式会社

【代表者】

出光 昭

【代理人】

【識別番号】

100081765

【弁理士】

【氏名又は名称】

東平 正道

【手数料の表示】

【予納台帳番号】

032517

【納付金額】

21,000円

特平11-270392

【提出物件の目録】

【物件名】

明細書 1

【物件名】

要約書 1

【包括委任状番号】 9201725

【プルーフの要否】 要

【書類名】

明細書

【発明の名称】 ダイオキシン類の分解方法

【特許請求の範囲】

塩素原子を1個以上有するダイオキシン類またはコプラナP 【請求項1】 CB類を分解するにあたり、該ダイオキシン類またはコプラナPCB類と、ラッ カーゼおよび/またはラッカーゼを生産する微生物を、水または土壌中で接触さ せることを特徴とするダイオキシン類の分解方法。

【請求項2】 ラッカーゼが、シゾフィラム (Schizophillum)属、プレウロタス(Pleurotus)属またはトラメテス(Tramet e s) 属に属する微生物が生産したラッカーゼを分離したものである請求項1記 載のダイオキシン類の分解方法。

【請求項3】 ラッカーゼを生産する微生物が、シゾフィラム (Schiz ophillum) 属、プレウロタス (Pleurotus) 属またはトラメテ ス (Trametes) 属に属する微生物である請求項1記載のダイオキシン類 の分解方法。

塩素原子を1個以上有するダイオキシン類またはコプラナP 【請求項4】 CB類と、ラッカーゼおよび/またはラッカーゼを生産する微生物とを、pHが 3~11の水または土壌中において接触させる請求項1~3のいずれかに記載の ダイオキシン類の分解方法。

【発明の詳細な説明】

[0001]

【発明の属する技術分野】

本発明は、都市ゴミや産業廃棄物の焼却設備などにおいて排出される焼却灰や 排気、排水さらにこの焼却灰の飛散に伴って汚染された土壌や汚染水などに含ま れる塩素化されたダイオキシン類やコプラナPCB類を分解して無害化する方法 に関する。

[0002]

【従来の技術】

人体に有害な物質としてよく知られている塩素化されたダイオキシン類やコプ

ラナPCB類は、都市ごみや産業廃棄物の焼却設備や様々な燃焼設備、機器類などから自然界に排出され、大きな社会問題となっている。

これら塩素化されたダイオキシン類には、種々の化学構造を有するものがあり、多塩素化ジベンゾーpーダイオキシン類や多塩素化ジベンゾフラン、コプラナPCB類などが知られている。これらの中でも、最も代表的な化合物は、2,3

<u>, 7,8-テトラクロロジベンゾーp-ジオキシンである。</u>

[0003]

これらダイオキシン類やコプラナPCB類は、生物により分解され難いことから、多くの生物の体内に吸収され、食物連鎖により、最終的には動物体内に蓄積されて濃縮され、催奇形成性を示すことが知られている。

そこで、これらダイオキシン類の発生を抑制する方法が検討され、提案されている。例えば、自動車や焼却炉などからの排出ガスを二段階で高温燃焼する方法が提案されている。しかしながら、これらダイオキシン類の発生を充分に抑制できるまでには至っていない。そして、大気中に放出されたダイオキシン類は、雨水や雪とともに地上に降りて土壌に蓄積される。このように、自然界に放置されたダイオキシン類を無害化するための有効な手段は見出されていない。

[0004]

近年、ダイオキシン類など自然界では分解されがたい化学物質の微生物による分解に関する研究がなされ、ある種の微生物が産生するリグニン分解酵素がダイオキシン類を分解することが報告されている [BIO INDUSTRY VOL.15 NO.2 P5-13 (1998):化学 VOL.52 NO.10 P24-25(1997)]。

これら報告では、さらに、微生物が産生するリグニン分解酵素によるダイオキシン類の分解に関し、担子菌類に属する木材腐朽菌のうちの白色腐朽菌が産生するリグニン分解酵素が、ダイオキシン類など様々な化学物質を分解する。この白色腐朽菌は、木材中の主成分である多糖類のセルロースやヘミセルロースを栄養源として生育し、これをエネルギーとして木材中のリグニンを分解する旨が述べられている。したがって、この白色腐朽菌が棲息する森林地帯においては、大気中から雨水などとともに地上に降り注いだダイオキシン類は、白色腐朽菌の産生するリグニン分解酵素によって分解されることになる。

[0005]

ところで、この白色腐朽菌によるリグニン分解酵素の生産は、培地の組成、特に窒素源の含有割合や、白色腐朽菌の増殖条件に左右される。したがって、白色腐朽菌の棲息条件によっては全くリグニン分解酵素を生産しないこともあり、安定性に欠けるという問題がある。

また、この白色腐朽菌が棲息する森林地帯を除く多くの地域においては、ダイオキシン類のさらなる蓄積が進行して、生物への影響が深刻な問題となるおそれが大きい。このような状況から、焼却設備などから自然界に排出されるダイオキシン類などを含む排気や排水、焼却灰、さらにこれらによって汚染された土壌などに蓄積されたダイオキシン類を分解して無害化するための技術の開発が強く要望されている。

[0006]

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、焼却設備などから自然界に排出されるダイオキシン類などを含む排気や排水、焼却灰、さらにこれらによって汚染された土壌などに蓄積されたダイオキシン類を、安定性の高い酵素や酵素の生産性の安定した微生物による分解によって無害化する方法を提供することを目的とするものである。

[0007]

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、前記課題を解決するために鋭意研究を重ねた結果、ラッカーゼ またはラッカーゼを生産する微生物が、塩素原子を1個以上有するダイオキシン 類またはコプラナPCB類を分解することを見出し、これら知見に基づいて本発 明を完成させるに至った。

[0008]

すなわち、本発明の要旨は、下記のとおりである。

(1) 塩素原子を1個以上有するダイオキシン類またはコプラナPCB類を分解するにあたり、該ダイオキシン類またはコプラナPCB類と、ラッカーゼおよび/またはラッカーゼを生産する微生物とを、水または土壌中で接触させることを特徴とするダイオキシン類の分解方法。

- (2) ラッカーゼが、シゾフィラム(Schizophillum)属、プレウロタス(Pleurotus)属またはトラメテス(Trametes)属に属する微生物が生産したラッカーゼを分離したものである、前記(1)に記載のダイオキシン類の分解方法。
- (3) ラッカーゼを生産する微生物が、シゾフィラム(Schizophill um) 属、プレウロタス (Pleurotus) 属またはトラメテス (Tram etes) 属に属する微生物である、前記 (1) に記載のダイオキシン類の分解方法。
- (4) 塩素原子を1個以上有するダイオキシン類またはコプラナPCB類と、ラッカーゼおよび/またはラッカーゼを生産する微生物とを、pHが3~11の水または土壌中において接触させる前記(1)~(3)のいずれかに記載のダイオキシン類の分解方法。

[0009]

【発明の実施の形態】

本発明の方法においては、塩素原子を1個以上有するダイオキシン類またはコプラナPCB類と、ラッカーゼおよび/またはラッカーゼを生産する微生物を水または土壌中において接触させることによって、これらダイオキシン類またはコプラナPCB類を分解し、人体あるいは他の動物に対して毒性がないか、より危険性の低い化合物に転化させて、無害化するのである。

[0010]

この場合、これら塩素原子を1個以上有するダイオキシン類やコプラナPCB類を、その発生源からの直接的な排気や排水、焼却灰、さらにこれらによって汚染された土壌より、分離して処理することも可能ではあるが、その取扱いには危険性が高いことから、排気や排水、焼却灰、汚染土壌そのものを処理するのが適切である。

[0011]

そして、ここで分解する塩素原子を1個以上有するダイオキシン類としては、 ジベンゾーp-ダイオキシンやジベンゾフランが有する2個のベンゼン環におけ る水素原子が塩素原子により置換された化合物であり、この塩素原子の置換数や ベンゼン環における置換位置には多種多様な化合物が存在する。これら塩素原子を有するダイオキシン類の中でも、1分子中に塩素原子を4個以上有する多塩素化物が特に人体に対する毒性が高く、そのような化合物としては、例えば、ジベンゾーp-ダイオキシンの多塩素化物としては、2, 3, 7, 8-テトラクロロジベンゾーp-ジオキシン、1, 2, 3, 7, 8-ペンタクロロジベンゾーp-ジオキシン、1, 2, 3, 4, 6, 7, 8-ヘキサクロロジベンゾーp-ジオキシン、1, 2, 3, 4, 6, 7, 8-ヘプタクロロジベンゾーp-ジオキシン、1, 2, 3, 4, 6, 7, 8-ヘプタクロロジベンゾーp-ジオキシン、1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9-オクタクロロジベンゾーp-ジオキシンなどの化合物がある。

[0012]

また、ジベンゾフランの多塩素化物としては、2,3,7,8ーテトラクロロジベンゾフラン、1,2,3,7,8ーペンタクロロジベンゾフラン、2,3,4,7,8ーペンタクロロジベンゾフラン、1,2,3,4,7,8ーヘキサクロロジベンゾフラン、1,2,3,6,7,8ーヘキサクロロジベンゾフラン、1,2,3,7,8,9ーヘキサクロロジベンゾフラン、2,3,4,6,7,8ーヘキサクロロジベンゾフラン、1,2,3,4,6,7,8ーヘプタクロロジベンゾフラン、1,2,3,4,6,7,8ーヘプタクロロジベンゾフラン、1,2,3,4,6,7,8,9ーオクタクロロジベンゾフランなどの化合物がある。

[0013]

[0014]

つぎに、これらダイオキシン類やコプラナPCB類の分解に用いるラッカーゼやこのラッカーゼを生産する微生物については、ラッカーゼ生産性の高い微生物、例えば、シゾフィラム(Schizophillum)属、プレウロタス(Pleurotus)属またはトラメテス(Trametes)属に属する微生物

そのものを用いてもよいし、これら菌体が生産したラッカーゼをイオン交換樹脂を用いる分離法などにより培養液から分離したラッカーゼを用いてもよい。さらに、ラッカーゼを生産する微生物の生菌体と、これら菌体の培養液から分離したラッカーゼとの混合物を用いてもよい。これらいずれの方法によっても実施することができるのであるが、ラッカーゼの活性を長期にわたって維持できるという点において、その生菌体を用いる方法が最も効果的である。

[0015]

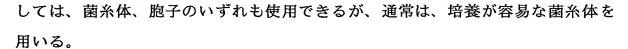
ここで、上記菌体の培養液から分離したラッカーゼを用いる場合には、このラッカーゼの活性を最大限発揮させるためにメディエーターを添加することが好ましい。このメディエーターとしては、例えば、1ーヒドロキシベンゾトリアゾールなどのフェノール性化合物や、2,2'ーアジノビス(3ーエチルベンゾチアゾリンー6ースルホン酸)などのアニリン系化合物が好適に用いられる。

[0016]

つぎに、上記のシゾフィラム(Schizophillum)属、プレウロタス(Pleurotus)属またはトラメテス(Trametes)属に属する微生物を培養する方法については、通常の微生物の培養方法と同様に行うことができる。例えば、実験室的には、ポテトデキストロース培地で5日間、20~40℃で培養するなどの方法によることができる。また、大量に培養する場合には、通常のタンクによる液体培養によるのが好ましいが、小麦全粒などの植物由来の固体成分や糖、窒素、リン、ミネラルなどを含浸させた無機多孔質担体などを用いた固体培養による方法を採用してもよい。

[0017]

そして、この場合の徴生物の培養においては、得られる培養物の菌濃度が、植物性有機物乾燥重量 1 gあたり、 1×10^2 c f u (コロニー形成単位)以上、好ましくは 1×10^2 $\sim1\times10^8$ c f u、より好ましくは 1×10^3 $\sim1\times10^7$ c f uの範囲とする。このような菌濃度とするのは、上記濃度未満であると、ダイオキシン類やコプラナ P C B 類を含む水や土壌に菌を接種した際に、菌の繁殖の遅れを招くおそれがある他、既に存在する菌に対して接種した菌が優先的に繁殖することが困難になることがあるためである。また、これら菌の培養に際



[0018]

つぎに、このようにして得られた上記微生物やその生産物であるラッカーゼを用いて、前記ダイオキシン類やコプラナPCB類を分解する接触反応については、その反応温度を10~85℃、好ましくは20~80℃において行う。この反応温度が10℃未満であると、水や土壌中での菌の増殖が遅く、またラッカーゼの反応も遅くなり、また、この反応温度が85℃を超えると、酵素が失活しやすくなることがある。

[0019]

また、この反応を行う際のこれらダイオキシン類やコプラナPCB類を含む水または土壌のpHは、3~11の範囲が好ましく、さらには3.5~10.5の範囲に調整するのがより好ましい。この水溶液のpHが3未満であると、ラッカーゼの反応が遅く、また、この水または土壌のpHが11を超えてもラッカーゼの反応が遅く、さらにこのラッカーゼが失活しやすくなる。したがって、この水または土壌のpHが3~11の範囲を外れている場合には、無機または有機の酸やアルカリ物質を添加してそのpHを調整し、ラッカーゼの反応を円滑に進行させるようにするのがよい。

[0020]

さらに、このダイオキシン類やコプラナPCB類を分解する接触反応の場に、 上記微生物またはラッカーゼの他に、銅化合物を添加してもよい。ここで添加す る銅化合物としては、例えば、硫酸銅や塩化銅などが好適に用いられる。これら 銅化合物の添加量は、ダイオキシン類やコプラナPCB類を含む水または土壌に 対して、0.01~1ミリモル濃度となるようにするのがよく、これら銅化合物 の添加により、ラッカーゼの生産性や安定性がより良好になる。

[0021]

【実施例】

つぎに、実施例および比較例により、本発明をさらに具体的に説明する。

〔実施例1〕

(1)ラッカーゼ生産微生物の培養

内容積250ミリリットルのマイヤーフラスコに、ポテトデキストロース24gを1リットルの水道水に溶解させて調製した液体培地50ミリリットルを注入し、シリコ栓により密栓した後、121℃で、20分間、殺菌処理した。

つぎに、このマイヤーフラスコを室温まで冷却し、ラッカーゼ生産微生物として、シゾフィラム・コムネ [Schizophillum commune; I FO6505]を、1白金耳植種した。ついで、このラッカーゼ生産微生物を接種した培養液を、28℃において20日間にわたり静置培養した。

[0022]

(2) ラッカーゼ活性の測定

p H値を4.5に調整したマロン酸緩衝液100ミリモルを含有する溶液に、上記(1)で得られた培養液を加えた。ついで、これに4-アミノアンチピリン 2ミリモルと、フェノール1ミリモルを加え、30℃において反応させた。

[0023]

つぎに、この反応の終了後、波長500nmの光についての吸光度を測定し、 この反応前の溶液の吸光度からの変化によりラッカーゼ活性を求めた。

このラッカーゼ活性の値は、1 c m光路長において1分間に吸光度を1増加させる酵素量を、1ユニットとして算出した。この結果、上記(1)において得られた培養物のラッカーゼ活性は、7.5ユニット/g乾物であった。

[0024]

(3) ダイオキシン類の分解反応

内容積250ミリリットルのマイヤーフラスコに、ポテトデキストロース24gを1リットルの水道水に溶解させて調製した液体培地50ミリリットルを注入した。

ついで、この培地に、ダイオキシン類として、2,3,7,8ーテトラクロロジベンゾダイオキシン、および2,3,7,8ーテトラクロロジベンゾフランを、それぞれ $100\mu g/2$.4ミリリットルの濃度で含むノナン溶液を等量混合した溶液0.24ミリリットルを加え、さらに、界面活性剤としてポリオキシエチレンソルビタンモノオレエート [花王アトラス社製: Tween80]を10

0μg加えてシリコセンで密栓した後、121℃で20分間殺菌した。

[0025]

つぎに、この培地に、ラッカーゼ生産微生物として、シゾフィラム・コムネ〔Schizophillum commune;IFO-6505〕を、1白金耳接種した。ついで、このラッカーゼ生産微生物を接種した培養液を、2日に1回の頻度でゆっくり攪拌しながら、28℃で20日間にわたり静置培養した。

培養の終了後、トルエン50ミリリットルを加えて、ラッカーゼによるダイオキシン類の分解反応を停止させた。ついで、ここで得られた2種のダイオキシン類を抽出し、GC-MSにより定量した。

また、比較のため、ラッカーゼ生産微生物を無添加で上記の操作を行い、その 場合のダイオキシンの残存量を100として、次式、

[0026]

【数1】

[微生物無添加時の残存ダイオキシン量ー微生物 添加時の残存ダイオキシン量]

 $\times 100(\%)$

〔微生物無添加時の残存ダイオキシン量〕

[0027]

により、上記シゾフィラム・コムネによるダイオキシン類の分解率を算出したところ、2,3,7,8-テトラクロロジベンゾダイオキシンに対する分解率は、72%であり、また、2,3,7,8-テトラクロロジベンゾフランに対する分解率は、81%であった。

[0028]

〔実施例2〕

(1)ラッカーゼ生産微生物の培養

ラッカーゼ生産微生物として、トラメテス・ベルシカラー〔Trametes versicolor; IFO-4941〕を用いた他は、実施例1の(1)と同様にした。

[0029]

(2)ラッカーゼ活性の測定

上記(1)で得られた培養液を用いた他は、実施例1の(2)と同様にしてラッカーゼ活性を求めた。この結果、上記(1)において得られた培養物のラッカーゼ活性は、12.4ユニット/g乾物であった。

(3) ダイオキシン類の分解反応

ラッカーゼ生産微生物として、トラメテス・ベルシカラー〔Trametes versicolor; IFO-4941〕を用いた他は、実施例1の(3)と同様にした。

この結果、上記トラメテス・ベルシカラーによる2,3,7,8ーテトラクロロジベンゾダイオキシンに対しては78%であり、また2,3,7,8ーテトラクロロジベンゾフランに対しては88%であった。

[0030]

〔実施例3〕

(1)ラッカーゼ生産微生物の培養

ラッカーゼ生産微生物として、トラメテス・ベルシカラー [Trametes versicolor; IFO-9791] を用いた他は、実施例1の(1) と同様にした。

[0031]

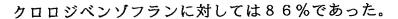
(2)ラッカーゼ活性の測定

上記(1)で得られた培養液を用いた他は、実施例1の(2)と同様にしてラッカーゼ活性を求めた。この結果、上記(1)において得られた培養物のラッカーゼ活性は、10.2ユニット/g乾物であった。

(3) ダイオキシン類の分解反応

ラッカーゼ生産微生物として、トラメテス・ベルシカラー〔Trametes versicolor; IFO-9791〕を用いた他は、実施例1の(3)と同様にした。

この結果、上記トラメテス・ベルシカラーによる 2, 3, 7, 8 ーテトラクロロジベンゾダイオキシンに対しては 79%であり、また 2, 3, 7, 8 ーテトラ



[0032]

[実施例4]

(1)ラッカーゼ生産微生物の培養

ラッカーゼ生産微生物として、トラメテス・ベルシカラー [Trametes versicolor; IFO-30340] を用いた他は、実施例1の(I

[0033]

)と同様にした。

(2)ラッカーゼ活性の測定

上記(1)で得られた培養液を用いた他は、実施例1の(2)と同様にしてラッカーゼ活性を求めた。この結果、上記(1)において得られた培養物のラッカーゼ活性は、13.9ユニット/g乾物であった。

(3) ダイオキシン類の分解反応

ラッカーゼ生産微生物として、トラメテス・ベルシカラー〔Trametes versicolor;IFO-30340〕を用いた他は、実施例1の(3)と同様にした。

この結果、上記トラメテス・ベルシカラーによる2,3,7,8ーテトラクロロジベンゾダイオキシンに対しては82%であり、また2,3,7,8ーテトラクロロジベンゾフランに対しては91%であった。

[0034]

〔実施例5〕

(1)ラッカーゼ生産微生物の培養

ラッカーゼ生産微生物として、トラメテス・ベルシカラー [Trametes versicolor; IFO-30388] を用いた他は、実施例1の(1)と同様にした。

[0035]

(2)ラッカーゼ活性の測定

上記(1)で得られた培養液を用いた他は、実施例1の(2)と同様にしてラッカーゼ活性を求めた。この結果、上記(1)において得られた培養物のラッカ

- ーゼ活性は、9.2コニット/g乾物であった。
 - (3) ダイオキシン類の分解反応

ラッカーゼ生産微生物として、トラメテス・ベルシカラー [Trametes versicolor; IFO-30388] を用いた他は、実施例1の(3) と同様にした。

この結果、上記トラメテス・ベルシカラーによる2,3,7,8ーテトラクロロジベンゾダイオキシンに対しては74%であり、また2,3,7,8ーテトラクロロジベンゾフランに対しては79%であった。

[0036]

〔実施例6〕

(1)ラッカーゼ生産微生物の培養

ラッカーゼ生産微生物として、プレウロタス・パルモナリス [Pleurot us pulmonaris; IFO-31345] を用いた他は、実施例1の (1) と同様にした。

[0037]

(2) ラッカーゼ活性の測定

上記(1)で得られた培養液を用いた他は、実施例1の(2)と同様にしてラッカーゼ活性を求めた。この結果、上記(1)において得られた培養物のラッカーゼ活性は、9、2ユニット/g乾物であった。

(3) ダイオキシン類の分解反応

ラッカーゼ生産微生物として、プレウロタス・パルモナリス [Pleurot us pulmonaris; IFO-31345] を用いた他は、実施例1の(3)と同様にした。

[0038]

この結果、上記プレウロタス・パルモナリスによる2,3,7,8ーテトラクロロジベンゾダイオキシンに対しては68%であり、また2,3,7,8ーテトラクロロジベンゾフランに対しては77%であった。

つぎに、これら実施例1~6の結果をまとめて第1表に示す。

[0039]



第 1 表

実施	微生物の種類	ラッカーゼ活性	2,3,7,8-テトラ クロロジベンゾ	
- Senso	1 10 11 11 11 11 11 11 11 11 11 11 11 11	(u/g乾物)	ダイオキシン分解率 (%)	V -
1	シゾフィラム・コ ムネ (IFO 6505)	7. 5	7 2	8 1
2	トラメテス・ベル シカラー (IFO 4941)	12.4	7 8	8 8
3	トラメテス・ベル シカラー (IFO 9791)	10.2	7 9	8 6
4	トラメテス・ペル シカラー (IFO 30340)	13.9	8 2	9 1
5	トラメテス・ベル シカラー (IFO 30388)	9. 2	7 4	7 9
6	プレロタス・パル モナリス (IFO 31345)	9. 2	6 8	77

[0040]

〔実施例7〕

(1)ラッカーゼ酵素液の調製

内容積500ミリリットルのマイヤーフラスコ5本に、それぞれ培地成分として、フスマ1.5gと、米ぬか1.5g, クヌギおが屑0.58g、硫酸銅・5水和物0.5mgを入れ、さらに水道水100ミリリットルを加えた。

[0041]

ついで、これらフラスコに密栓をしてオートクレーブに入れ、121℃において、20分間殺菌した。

つぎに、この培地を室温に冷却した後、上記フラスコ5本にそれぞれラッカーゼ生産微生物として、シゾフィラム・コムネ [Schizophillum commune; IFO-6505]を1白金耳接種し、温度25℃、回転数110rpmにおいて、3日間にわたり振とう培養をした。その後、温度25℃において7日間にわたり、静置培養した。

[0042]

培養終了後、これら5本のフラスコ内の培養物を集め、11,000Gにおいて遠心分離することにより、上澄み液を得た。この上澄み液のラッカーゼ活性は、12.0ユニット/gであり、リグニンパーオキシダーゼおよびマンガンパーオキシダーゼの活性は認められなかった。

ついで、得られた上澄み液に、その腐敗防止のために、10w/v%濃度の塩 化ベンザルコニウム液〔日本製薬社製〕を1.0ミリリットル加え、さらに水道 水を加えて全量を500ミリリットルとして、ラッカーゼ酵素液を調製した。

[0043]

(2) ダイオキシン類含有水の調製

流動床式の焼却炉から採取したダイオキシン類を含む都市ゴミ焼却灰200g に、2規定濃度の塩酸1リットルを加えて、2時間放置した。

ついで、この液を吸引濾過して得た上澄み液に、ジクロルメタン1リットルを加え、室温において2時間にわたり液-液抽出をした。また、吸引濾過で得られた焼却灰に、トルエン1リットルを加え、室温において、攪拌下に48時間にわたって抽出した。

[0044]

つぎに、上記ジクロルメタン抽出液とトルエン抽出液を混合して、これを無水

硫酸ナトリウムにより脱水した後、減圧濃縮乾固した。さらに、この濃縮乾固物に、界面活性剤としてポリオキシエチレンソルビタンモノオレエート〔花王アトラス社製:Tween80〕を5ミリリットルを加え、ついで水道水1リットルを加えて混合し、ダイオキシン類を含有する水を調製した。

[0045]

(3) ダイオキシン類の分解反応

内容積250ミリリットルのマイヤーフラスコに、上記(2)で調製したダイオキシン類を含有する水25ミリリットルを入れ、1規定濃度の塩酸を加えて、ダイオキシン類含有水のpHを3.5に調整した。

つぎに、このダイオキシン類含有水に、上記(1)で調製したラッカーゼ酵素 液25ミリリットルを加え、50℃で3時間攪拌して、ダイオキシン類のラッカ ーゼ酵素による分解反応を行った。

[0046]

反応終了後、ジクロルメタンを加えて反応を完全に停止させ、反応液中に残存 するダイオキシン類の量を測定して、ダイオキシン類の分解率を算出した。

ここでの、ダイオキシン類の分解率の算出には、比較のためにpHを7.0とし、かつラッカーゼ酵素無添加の場合のダイオキシン類の含有量を100として、次式により算出した。

[0047]

【数2】

〔酵素無添加試料-酵素添加試料〕

 $\times 100 (\%)$

〔酵素無添加試料〕

[0048]

この結果、この反応におけるダイオキシン類の分解率は、38%であった。 [実施例8~12] 実施例7の(3)におけるダイオキシン類含有水のpHを、順次、4.5 [実施例8]、5.5 [実施例9]、7.0 [実施例10]、9.0 [実施例11]、10.0 [実施例12]に調整した他は、実施例7の(3)と同様にして、ダイオキシン類のラッカーゼ酵素による分解反応を行った。なお、実施例11および12においては、1規定濃度の水酸化ナトリウムを加えてダイオキシン類含有水のpHの調整をした。

これら結果を、実施例7も含めて第2表に示す。

[0049]

[比較例1~2]

ダイオキシン類含有水のpHを、順次、2.0 [比較例1]、11.5 [比較例2] に調整した他は、実施例7の(3)と同様にして、ダイオキシン類のラッカーゼ酵素による分解反応を行った。なお、比較例2においては、1規定濃度の水酸化ナトリウムを加えてダイオキシン類含有水のpHの調整をした。

これら結果を、第2表に示す。

[0050]

【表2】

第 2 表

実施例 (比較例)	微生物の種類	反応液のpH	ダイオキシンの 分解率 (%)
7	シゾフィラム・コムネ (IFO 6505)	3. 5	3 8
8	シゾフィラム・コムネ (IFO 6505)	4. 5	7 4
9	シゾフィラム・コムネ (IFO 6505)	5. 5	7 6
1 0	シゾフィラム・コムネ (IFO 6505)	7. 0	7 2
1 1	シゾフィラム・コムネ (IFO 6505)	9. 0	5 8
1 2	シゾフィラム・コムネ (IFO 6505)	10.0	4 1
(1)	シゾフィラム・コムネ (IFO 6505)	2. 0	11
(2)	シゾフィラム・コムネ (IFO 6505)	11. 5	2 3

[0051]

[実施例8~12]

ラッカーゼ生産微生物として、トラメテス・ベルシカラー [Trametes versicolor; IFO-30340] を用いた他は、実施例7の(1



)と同様にして、ラッカーゼ酵素液を調製した。

ついで、実施例7の(2)と同様にして調製したダイオキシン類含有水を使用し、これを1規定濃度の塩酸または1規定濃度の水酸化ナトリウムにより、そのpHを順次、3.5 [実施例13]、5.0 [実施例14]、6.0 [実施例15]、7.0 [実施例16]、8.5 [実施例17]、9.5 [実施例18]に調整した他は、実施例7の(3)と同様にして、ダイオキシン類のラッカーゼ酵素による分解反応を行った。

これら結果を、第3表に示す。

[0052]

[比較例3~4]

ダイオキシン類含有水のpHを、順次、2.0 [比較例3]、11.5 [比較例4] に調整した他は、実施例 $8\sim12$ と同様にして、ダイオキシン類のラッカーゼ酵素による分解反応を行った。

これら結果を、第3表に示す。

[0053]

【表3】

第 3 表

実施例 (比較例)	微生物の種類	反応液のp H	ダイオキシンの 分解率 (%)
1 3	トラメテス・ベルシカ ラー (IFO 30340)	3, 5	4 2
1 4	トラメテス・ベルシカ ラー (IFO 30340)	5. 0	7 8
1 5	トラメテス・ベルシカ ラー (IFO 30340)	6. 0	8 2
1 6	トラメテス・ベルシカ ラー (IFO 30340)	7. 0	6 9
1 7	トラメテス・ベルシカ ラー (IFO 30340)	8. 5	6 2
1 8	トラメテス・ベルシカ ラー (IFO 30340)	9. 5	6 0
(3)	トラメテス・ベルシカ ラー (IFO 30340)	2. 0	1 4
(4)	トラメテス・ベルシカ ラー (IFO 30340)		2 7

[0054]

[実施例19~24]

ラッカーゼ生産微生物として、プレウロタス・パルモナリス [Pleurot us pulmonaris; IFO-31345] を用いた他は、実施例 $7 \, \sigma$ (1) と同様にして、ラッカーゼ酵素液を調製した。



ついで、実施例7の(2)と同様にして調製したダイオキシン類含有水を使用し、これを1規定濃度の塩酸または1規定濃度の水酸化ナトリウムにより、そのpHを順次、3.5 [実施例19]、5.0 [実施例20]、7.0 [実施例21]、8.0 [実施例22]、9.0 [実施例23]、10.0 [実施例24]に調整した他は、実施例7の(3)と同様にして、ダイオキシン類のラッカーゼ

酵素による分解反応を行った。

これら結果を、第4表に示す。

[0055]

[比較例5~6]

ダイオキシン類含有水のpHを、順次、2.0 [比較例5]、11.5 [比較例6] に調整した他は、実施例 $8\sim12$ と同様にして、ダイオキシン類のラッカーゼ酵素による分解反応を行った。

これら結果を、第4表に示す。

[0056]

【表4】

第 4 表

実施例 (比較例)	微生物の種類	反応液のpH	ダイオキシンの 分解率 (%)
1 9	プレロタス・パルモナ リス (IFO 31345)	3. 5	3 5
2 0	プレロタス・パルモナ リス (IFO 31345)	5. 0	7 8
2 1	プレロタス・パルモナ リス (IFO 31345)	7. 0	7 2
2 2	プレロタス・パルモナ リス (IFO 31345)	8. 0	6 4
2 3	プレロタス・パルモナ リス (IFO 31345)	9. 0	5 8
2 4	プレロタス・パルモナ リス (IFO 31345)	10.0	4 6
(5)	プレロタス・パルモナ リス (IFO 31345)	2. 0	1 8
(6)	プレロタス・パルモナ リス (IFO 31345)	1 1. 5	2 2

[0057]

【発明の効果】

本発明によれば、都市ゴミや産業廃棄物などの焼却に伴って発生する塩素化ダイオキシン類やコプラナPCB類を、酵素生産の安定性に優れたラッカーゼ生産 微生物または該微生物が生産したラッカーゼにより効果的に分解させて無害化す ることができる。

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 人体に対して有害な塩素化されたダイオキシン類やコプラナPC B類を、酵素生産の安定性に優れた微生物により効率よくを分解して無害化する ことのできる方法を提供する。

【解決手段】塩素原子を1個以上含有するダイオキシン類およびコプラナPC B類を、ラッカーゼおよび/またはラッカーゼを生産する微生物と、水または土 壌中において接触させて分解する方法。

【選択図】 なし

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[000183646]

1. 変更年月日 1990年 8月 8日

[変更理由] 新規登録

住 所 東京都千代田区丸の内3丁目1番1号

氏 名 出光與産株式会社

		•		
				(1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1
			,	
			÷	
79				
Ą				